

胞内流式细胞术实验方案

流式细胞术实验方案

概述:

流式细胞术是一种强大的工具,可应用于免疫学、病毒学、分子生物学和癌症生物学等多个学科。当单细胞悬浮在缓冲溶液中流过激光时,流式细胞术可对其进行快速分析。分析每个颗粒的可见光散射和荧光参数。可见光散射在两个不同的方向上进行测量,前向(前向散射或 FSC)可指示细胞的相对大小,侧向散射(SSC)可显示细胞的粒度。

*该协议仅供参考。请优化程序,因为不同样品的实验条件可能有所不同。

1. 将所需数量的细胞等分到管或孔中。(通常,每次测定 5×10^5 至 1×10^6 个细胞)。
2. 离心细胞并弃去上清液。
3. 加入 1mL PBS (1% FBS), 4°C 、2000 g 离心 4 分钟。丢弃上清液。
4. 重复步骤 3 两次。
5. 将细胞沉淀重悬于 200 μL 固定/透化缓冲液中。室温孵育 30 分钟。避光。
6. 添加 400 μL 1x 透化缓冲液,并在室温下以 2000 g 离心 5 分钟。丢弃上清液。
7. 重复步骤 6 一次。
8. 用 2% 正常山羊血清 (1x 透化缓冲液) 进行封闭。室温孵育 15 分钟。
9. 无需清洗,向细胞中添加推荐量的一抗,并在室温下孵育 60 分钟。
10. 添加 300 μL 1x 透化缓冲液,并在室温下以 2000 g 离心 5 分钟。丢弃上清液。
11. 重复步骤 10 一次。
12. 将推荐量的二抗添加到每个管中,室温避光孵育 30 分钟。
13. 添加 400 μL 1x 透化缓冲液,并在室温下 2000 g 离心 5 分钟,丢弃上清液。
14. 重复步骤 13 一次。
15. 将细胞重悬于 300 μL PBS 中,并在流式细胞仪上进行分析。

*仅适于研究应用,不可用于诊断或治疗用途。

建议的缓冲液:

缓冲液	成分
1x 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)	8 克氯化钠、0.2 克氯化钾、1.44 克磷酸氢二钠、0.24 克磷酸氢二钾。用 HCl 将 pH 调节至 7.4。
固定/透化缓冲液	eBioscience™ 固定/透化浓缩液(00-5123-43); eBioscience™ 固定/透化稀释剂 (00-5223-56)用 3 份稀释剂稀释 1 份浓缩液
1x 透化缓冲液	eBioscience™ 透化缓冲液 (10X)(00-8333-56)用 蒸馏水稀释十倍。